

ブタ体細胞核移植胚の発生能改善に関する研究

Improvement in developmental competence of reconstructed porcine embryos transferred nucleus of somatic cells

紫野正雄, 柏崎直巳, 猪股智夫

麻布大学大学院 獣医学研究科

Masao Shino, Naomi Kashiwazaki and Tomo Inomata

Graduate School of Veterinary Science Azabu University

Abstract. Somatic cell nuclear transfer cloned (SCNT) embryos have still lower developmental competence in the pig. However, transgenesis through somatic cell cloning in pigs has more advantage than conventional DNA micro-injection method. The aim of the present study was to improve the competence of SCNT porcine embryos, we examined that embryonic development *in vitro* of aggregated embryos between SCNT and parthenogenetic embryos. In Experiment I, rates of successful aggregation and development to the blastocyst stage were assessed. *In vitro* matured porcine oocytes were electro-stimulated (1 kV/cm, 64 μ sec, three times, interval of 0.5 sec) and cultured with 5 μ g cytochalasin B for 2 hours (h) to obtain diploid parthenogenetic embryos. At 48 or 72 h, the zona pellucidae of activated oocytes were removed with 0.5 % pronase, the zona-free embryos were treated with aggregation (48 h + 48 h, 48 h + 72 h, 72 h + 72 h), and cultured *in vitro*. The zona-free embryos at 48 h post electro-activation were also cultured as control. The successful aggregation rates and the blastocyst formation rates were 58.6 % (60/103) and 50.5 % (52/103) in the 48 h + 48 h treatment, 28.5 % (43/151) and 22.5 % (34/151) in the 48 h + 72 h treatment, and 38.6 % (71/184) and 28.8 % (53/184) in the 72 h + 72 h treatment, respectively. The rate of the 48 h + 48 h treatment was significantly ($P < 0.05$) higher than other treatment groups. In addition, the blastocyst formation rate of the 48 h + 48 h treatment was significantly ($P < 0.05$) higher than the control (36.7 %, 18/49). In Experiment II, the SCNT embryos and parthenogenetic embryos at 48 h post-activation were treated with aggregation, and cultured *in vitro*. The successful aggregation rate and the blastocyst formation rate were 38.2 % (39/102) and 55.3 \pm 4.3 %, respectively, and the blastocyst formation rate was significantly ($P < 0.05$) higher than the control (20.9 %, 9/43). The results of the present study indicated that development to the blastocysts stage of porcine SCNT embryos aggregated with parthenogenetic embryos was improved.

目 的

ブタは非常に重要な家畜であるばかりでなく、その臓器の形態および機能がヒトに類似しており、実験動物としても重要である。さらに、遺伝子組換え技術によるヒトへの臓器提供動物としての遺伝子組換えブタの開発もさかんにおこなわれている。ブタ

における、個体レベルでの遺伝子組換え体の作出方法は、前核期胚への顕微注入法が主に適用されてきたが、この方法では導入遺伝子がランダムにしか挿入できないため、ヒトへの臓器提供動物としての遺伝子組換えブタの開発には適さない。通常、哺乳動物における個体レベルでの特定遺伝子に対する破壊（ジーンターゲットイング）は、マウスにおいてのみ、

ES細胞を介した安定した方法が確立されているが、ブタでは生殖系列へ分化するES細胞が樹立されていない。そこで、体細胞に対して特定遺伝子に対する破壊をおこない、その細胞を核移植のドナーとして体細胞核移植胚を作製して、これを胚移植により個体発生させれば、目的の特定遺伝子を破壊させた遺伝子組換えブタが作出することができる。しかし、現在の技術では、ブタ体細胞核移植胚の発生能は低く、産子作出効率は極めて低い。

本研究は、体細胞核移植胚による特定遺伝子破壊ブタの作出システムの構築を最終的な目的に、ブタ体細胞核移植胚の発生能の改善を目的として、体細胞核移植胚を人為的単為発生胚と集合させ、その集合胚の発生能を検討した。

方 法

(未成熟卵の採取と体外成熟)

神奈川県食肉衛生検査所厚木支所・東京都食肉衛生検査所八王子支所にて、未成熟のメスブタから採取したの卵巣を38℃の乳酸リンゲル液にて研究室へ移送した。18G注射針を装着した5mlシリンジを用いて、直径2-5mmの卵巣より卵丘細胞・卵複合体(cumulus and oocyte complexes; COCs)を含む卵胞液を吸引採取した。その後、回収したCOCsを体外成熟培養(*in vitro* maturation: IVM)培地で3回洗浄した。IVM培地としては、North Carolina State University-37; NCSU-37 Basic [98 mM NaCl (Sigma, St.Louis, MO, USA), 4.3 mM KCl (Sigma, St.Louis, MO, USA), 2.1 mM KH₂PO₄ (Sigma, St.Louis, MO, USA), 1.5 mM CaCl₂ · 2H₂O (Wako, Osaka, Japan), 1.5 mM MgSO₄ · 7H₂O (Sigma, St.Louis, MO, USA), 23 mM NaHCO₃ (Sigma, St.Louis, MO, USA), 0.9 mM Glutamine (Sigma, St.Louis, MO, USA), 5 mM Glucose (Sigma, St.Louis, MO, USA), 11 mM Solbitol (Sigma, St.Louis, MO, USA)] に10%ブタ卵胞液(PFF), 6 mM L-cystein (Sigma, St.Louis, MO, USA), 50 μM β-ME (Sigma, St.Louis, MO, USA), 10 IU/ml eCG (Teikoku Zoki, Tokyo, Japan), 10 IU/ml hCG (Sankyo, Tokyo, Japan), 抗生物質 [0.1 mg/ml Streptomycin (Sigma, St.Louis, MO, USA), 100 IU/ml Penicillin G potassium (Sigma, St.Louis, MO, USA)] を添加したNCSU-37 Firstを使用した¹⁾。IVMは微小

滴培養法でおこない、50 μl スポットあたり約50個のCOCsを入れ、NCSU-37 Firstで20時間培養した後、ホルモンを添加していないNCSU-37 Secondにて28時間培養した。IVMは、炭酸ガスインキュベーターにて、38.5℃、5% CO₂、95% 空気、湿度飽和の条件で行った。

(胚の体外培養)

核移植胚の培養は、炭酸ガスインキュベーターにて、38.5℃、5% CO₂、95% 空気、湿度飽和の条件でおこなった。培養開始後48時間まではIVC Pyr-Lac (1.5 mM CaCl₂ · 2H₂O, 98 mM NaCl, 4.3 mM KCl, 2.1 mM KH₂PO₄, 1.5 mM MgSO₄ · 7H₂O, 23 mM NaHCO₃, 0.9 mM Glutamine, 11 mM Solbitol, 0.17 mM Na-Pyruvate (Sigma, St.Louis, MO, USA), 2.73 mM Na-lactate (Sigma, St.Louis, MO, USA), 50 μM β-ME, 0.1 mg/ml Streptomycin, 100 IU/ml Penicillin G potassium, 4 mg/ml BSA) を用い、その後IVC Glu (1.5 mM CaCl₂ · 2H₂O, 98 mM NaCl, 4.3 mM KCl, 2.1 mM KH₂PO₄, 1.5 mM MgSO₄ · 7H₂O, 23 mM NaHCO₃, 0.9 mM Glutamine, 11.0 mM Solbitol, 5.55 mM Glucose, 0.1 mg/ml Streptomycin, 100 IU/ml Penicillin G potassium, 50 μM β-ME, 4 mg/ml BSA) を用いて96時間培養をおこなった²⁾。

(顕微操作用ピペットの準備)

1% HClで洗浄した後、乾熱滅菌したガラスピペット (SUTTER INSTRUMENT O.D.:1.0 mm, I.D.:0.75 mm 10 cm length CATALOG #: B100-75-10) をピペットプラー (SUTTER INSTRUMENT CO., CA, USA) で引いたものを使用した。ピペットプラーの設定は、HEAT = 685, PULL = 50, VEL = 120, TIME = 200で行った。顕微操作用ピペットは、マイクロフォージ (NARISIGE, Tuchiura, Japan) を用いて以下のように作成した。除核(染色体除去)用ピペットは、ピペットの内径が20-25 μmとなるように切断した。卵保持用ピペットは、ピペットの外径が150-180 μmとなるように切断し、マイクロフォージで内径が15-25 μmとなるように鈍化した。核注入用ピペットは、ピペットの内径が7-10 μmとなるように切断した。

(ドナー細胞の準備)

IVM 40時間後にCOCsの卵丘細胞を裸化した際に得られた細胞をIVC Pyr-Lacに20 mM Hepes (Sigma, St.Louis, MO, USA) を添加したメディウム (IVC + Hepes) で三回洗浄し、核移植の核のドナー細胞として使用した。

(除核および核移植)

顕微操作は、すべてピエゾマイクロマニピュレーター (NARISIGE, Tuchiura, Japan) を装備したホフマン装置付き倒立顕微鏡下 (OLYMPUS IX70, Tokyo, Japan) で行った。90 mm プラスチックシャーレ (IWAKI, Tokyo, Japan) の蓋を利用し、除核操作培地としてIVC + HepesにサイトカラシンB (Sigma, St.Louis, MO, USA) を5 mg/ml 添加したメディウム (以下、IVC + CB) を20 μ l, 核移植操作培地としてIVC + Hepesを20 μ l, ピペット洗浄用にIVC + HepesにPolyvinylpyrrolidone; PVP (Sigma, St.Louis, MO, USA) を12% 添加したメディウム (以下、12% PVP) 10 μ lのスポットを数個ずつ作り、ミネラルオイル (Kanto Chemical, Tokyo, Japan) で表面を覆った。

IVM 終了後に150 IU/ml ヒアルロニダーゼ (Sigma, St.Louis, MO, USA) に浸漬させ、ピペッティングにより卵丘細胞を除去した。卵丘細胞除去卵を実体顕微鏡下で観察し、第一極体を放出した卵を成熟卵として実験に供した。成熟卵は、IVC Pyr-Lac 内で実験までの間38.5 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 湿度飽和の条件で保存した。裸化した成熟卵をIVC + CBのスポットに約10個ずつ移し、38.5 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 湿度飽和の条件で15分間感作させた後、除核操作を施した³⁾。

除核操作ピペットおよび核移植操作ピペットは、12% PVP内で水銀を吐き出し、12% PVPの吸引、吐き出しを数回繰り返すことでピペット内部を洗浄した後に使用した。卵保持用ピペットで成熟卵を回転させ、第一極体を3時の位置で保持した。保持した卵の第一極体と第一極体に近接して存在しているとされるM期染色体を少量の細胞質とともに除核用ピペットにより吸引除去した。除核操作を施した卵は、5 μ g/ml のHoechst33342 (Sigma, St.Louis, MO, USA) で染色し蛍光顕微鏡下で核の有無を確認し、核が確認されなかったものをレシピエント卵と

して使用した。除核した卵は、IVC Pyr-Lacで30分間修復培養後、形態が正常なものを選抜し、核移植に使用した。CB無添加の核移植操作培地内で核移植用ピペットを用いてドナー細胞を数回ピペッティングすることにより卵丘細胞細胞膜を破壊し、核をゆっくり除核卵細胞質内に注入した³⁾。核を注入した卵は、IVC Pyr-Lacで1.5時間培養した。そして、核を注入した卵を0.3 M mannitol [0.3 M mannitol (Sigma, St.Louis, MO, USA), 1.0 mM CaCl₂ (Kanto Chemical, Tokyo, Japan), 0.1 mM MgCl₂ (Sigma, St.Louis, MO, USA), 0.5 mM Hepes] で満たした電気細胞融合装置 (TR Tech, Tokyo, Japan) の陰陽両極を連結した電気刺激チャンバーの平行電極間に核移植胚を静置し、直流パルス1.5 kv/cm, 99 μ s, 1回印加の条件で電気活性化処理を施した。その後、第二極体の放出を抑制するためにIVC + CBで2時間培養し、IVCに供した。

(単為発生胚の作出)

IVMをおこなった後に得られた成熟卵を0.3 M mannitolで満たした電気細胞融合装置の陰陽両極を連結した電気刺激チャンバー平行電極間に静置し、1 kV/cm, 64 μ s, 0.5 sec, 3回印可の条件にて電気活性化処理を施した。その後、第二極体放出を抑制するためにIVC + CBで2時間培養した後、IVCをおこなった⁴⁾。

(体外受精)

15 $^{\circ}$ Cで保存した三種混合液状精液に750 \times g, 1分間、室温の条件下で遠心処理を施し、上精を除去した。上精除去後、pH 7.8に調整したM-199 preincubationメディウム [M-199 with Earle's salts, 3.05 mM Glucose, 2.92 mM Calcium lactate (Sigma, St.Louis, MO, USA), 0.91 mM Na-pyruvate, 2 mM Caffein (Sigma, St.Louis, MO, USA), 25 mM NaHCO₃, 100 IU/ml Penicillin G potassium, 0.1 mg/ml Streptomycin] を精子濃度が 3×10^8 となるように添加し、38.5 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 湿度飽和の条件で3時間前培養をおこなった⁵⁾。受精培地には、Pig-FM⁶⁾ [90 mM NaCl, 12 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 0.5 mM NaH₂PO₄, 0.5 mM MgSO₄, 10 mM Na-lactate (Sigma, St.Louis, MO, USA), 10 mM Hepes, 8 mM CaCl₂,

2 mM Na-pyruvate, 2 mM Caffeine, 5 mg/ml BSA] を使用した。前培養した精子浮遊液 10 μ l を, IVM 40 時間後の COCs が約 20 個入った 90 μ l の Pig-FM に導入した。精子の最終濃度は, 3×10^6 になるように調整した。精子と卵の共培養は, 38.5 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 湿度飽和の条件で 4 時間おこなった⁽⁴⁸⁾。共培養後, IVC + Hepes へ卵を移し卵丘細胞および付着した精子をピペッティングにより除去し, 第一極体および第二極体を放出しているものを選抜し, IVC をおこなった。

(胚の固定, 染色)

胚の固定, 染色および観察には IVC 開始 168 時間で得られた胚盤胞を用いた。透明帯を除去した集合胚の胚盤胞は, 0.9% クエン酸ナトリウム (Wako, Osaka, Japan) に 5 分間浸漬させた後, カルノア液 [酢酸 (Kanto Chemical, Tokyo, Japan) : エタノール = 1 : 3] で固定し, 10% ギムザ (Merck, Tokyo, Japan) で染色した⁸⁾。また, 透明帯除去をおこなっていない胚の胚盤胞は, カルノア液にて固定・脱脂し, 45% 氷酢酸液に 1% オルセイン (Sigma, St. Louis, MO, USA) を添加したアセトオルセイン溶液で 15 分間染色後, アセトグリセロール [酢酸 : グリセロール (Wako, Osaka, Japan) : DW = 1 : 1 : 3] にて置換しマニキュアにより封入した⁷⁾。染色した標本は位相差顕微鏡 (OLYMPUS BX41, Tokyo, Japan) 下で胚盤胞細胞数を観察した。

(実験 1 : プタ単為発生胚同士の集合胚の発生能)

集合条件の検討を目的として, 集合処置に用いる胚の培養時間, 発生ステージの違いが, 胚の集合率および集合胚の発生能の及ぼす影響について単為発生胚を用いて調べた。作出した単為発生胚を IVC Pyr-Lac にて 48 あるいは 72 時間培養後, 0.5% pronase (Kakenseiyaku, Tokyo, Japan) により透明帯を除去し, IVC Glu で 3 回洗浄した。培養 48 時間では 2 細胞期胚と 4 細胞期胚, 培養 72 時間では 2 細胞期胚と 4 細胞期胚と 8 細胞期胚が得られた。洗浄した胚は, IVC Glu を 2 ml 入れた 35 mm シャーレ (Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA) の底にアグリゲーションニードル (Biological Laboratory Equipments Maintenance and Service Ltd., Budapest, Hungary) を用

いて作製した深さ約 250 μ m の穴に入れ集合処理をおこなった⁸⁾。透明帯を除去した培養時間の異なる単為発生胚を, 3 通りの組み合わせ (48 h + 48 h 区, 48 h + 72 h 区, 72 h + 72 h 区) で集合させ, その集合率と胚盤胞への発生率および細胞数を調べた。また, 完全に胚同士が集合しなかった胚盤胞 (Figure 2) はカウントしなかった。さらに, 培養 48 あるいは 72 時間で得られた単為発生胚の分割ステージごとの組み合わせによる集合率および胚盤胞への発生率を調べた。また, 対照区として活性化処理 48 h 後に透明帯を除去し, 集合させずに培養した単為発生胚の発生能についても調べた。

(実験 2 : プタ体細胞核移植胚と単為発生胚による集合胚の発生能)

核移植胚と単為発生胚を集合させ, その集合胚の発生能について検討をおこなった。卵丘細胞をドナーとした核移植胚と単為発生胚の透明帯をそれぞれ電気活性化処理 48 h 後に除去し, 実験 1 と同様に集合処理を施し, その集合率と胚盤胞への発生率および細胞数を調べた。さらに, 核移植胚と単為発生胚の分割ステージごとの組み合わせによる集合率および胚盤胞への発生率を調べた。また, 対照区として活性化処理 48 h 後に透明帯を除去し, 集合させなかった核移植胚の発生能も調べた。

(統計)

統計処理は StatView を用い, 集合率および胚盤胞への発生率は χ^2 -検定, 胚盤胞細胞数は student の t-検定によりおこなった。

結 果

(実験 1 : プタ単為発生胚どうしの集合胚の発生能)

透明帯を除去した単為発生胚どうしの集合率および胚盤胞への発生率は, 48 h + 48 h 区で 58.3% (60/103) および 50.5% (52/103), 48 h + 72 h 区で 28.5% (43/151) および 22.5% (34/151), 72 h + 72 h 区で 38.6% (71/184) および 28.8% (53/184) となり, 48 h + 48 h 区が他の集合処理区と比較して有意に ($P < 0.05$) 高い値を示した。また, 対照区である活性化処理 48 h 後に透明帯を除去し, 集合させずに培養した単為発生胚の胚盤胞への発生率は

36.7% (18/49) となり 48 h + 48 h 区と比較して低い傾向を示した。細胞数は、すべての集合処理区において透明帯を除去した単為発生胚と比較して有意に ($P < 0.05$) 高い値を示した。

発生ステージごとの単為発生胚どうしの組み合わせによる集合胚の集合率および胚盤胞への発生率は、48 h + 48 h 区においては2細胞期胚と2細胞期胚、4細胞期胚と4細胞期胚の組み合わせが2細胞期胚と4細胞期胚の組み合わせと比較して高い傾向を示した。48 h + 72 h 区においては、2細胞期胚と2細胞期胚の組み合わせが有意に ($P < 0.05$) 高い値を示した。72 h + 72 h 区においては、4細胞期胚と4細胞期胚の組み合わせが有意に ($P < 0.05$) 高い値を示した。

(実験2：ブタ体細胞核移植胚と単為発生胚による集合胚の発生能)

活性化処理 48 h 後に透明帯を除去した核移植胚と単為発生胚による集合胚の集合率は 42.2% となった。また、胚盤胞への発生率 (Figure 3) および細胞数はそれぞれ 40.7% (37/91), 55.3 ± 4.3 , 対照区である透明帯を除去し集合させずに培養した核移植胚ではそれぞれ 20.9% (9/43), 25.3 ± 2.5 となり、集合胚が対照区と比較して有意に ($P < 0.05$) 高い値を示した。また、核移植胚と単為発生胚の組み合わせによる集合率および胚盤胞への発生率は、2細胞期核移植胚と2細胞期単為発生胚、4細胞期核移植胚と4細胞期単為発生胚の組み合わせが2細胞期単為発生胚と4細胞期核移植胚の組み合わせと比較して高い傾向を示した。

考 察

本研究において、活性化処理 48 時間後に透明帯を除去したブタ体細胞核移植胚と単為発生胚を集合させることで発生能が改善されることが示唆された。Boiani らは、4細胞期のマウス体細胞核移植胚どうしを集合させることで発生能が改善されることを報告しており⁹⁾、本研究においても同様の結果が得られた。また、本研究で集合条件について検討したところ 48 h + 48 h 区における集合率は、48 h + 72 h 区、72 h + 72 h 区と比較して有意に高くなることが示唆された。このことから、胚の集合には、集合処理に用いる胚の活性化処理後の培養時間が関与しており、

その主な原因のひとつとして胚のコンパクションによる影響が考えられる。哺乳類において受精後8細胞期初期までの受精卵は、均一な微絨毛におおわれており、割球間には細胞結合は存在していない。マウスにおいては8細胞期後期にコンパクションと呼ばれる変化が生じ、細胞境界が密着するのが観察されている¹⁰⁾。コンパクションした胚には細胞接着因子のE-カドヘリンどうしの接着による接合帯が各割球の上端部に形成される¹¹⁾。マウスの初期胚では、コンパクションの1~2時間後からE-カドヘリンの一部がその上端側に発現し始め、徐々に多くの因子が集合し、約24時間後には密着結合が完成する。これにより胚内部と外部は完全に遮断され、液体も通過することはできなくなる¹²⁾。この事象がブタ胚どうしを集合させる際の障害になっているのではないかと考えられる。ブタの場合、桑実期胚の間にコンパクションと脱コンパクションを繰り返しながら発生が進行し、胚盤胞の直前でコンパクションが起こることが報告されている¹³⁾。このことから、ブタにおいては活性化処理48時間後に得られた胚ではまだコンパクションが起こっていないと考えられ、これが要因となり集合率が他の集合処理区と比べて有意に高かったのではないかと考えられる。それに対し、72 h + 72 h 区における集合率が48 h + 48 h 区と比較して有意に低下したことから、ブタ初期胚は活性化処理72時間付近でコンパクションを起こし始めているのではないかと考えられる。48 h + 72 h 区においても同様に活性化処理72時間後に得られた胚がコンパクションを起こし始めていたことが集合率を有意に低下させた原因ではないかと考えられる。また、コンパクションは受精卵に見られる最初の極性の出現であり、生じた細胞間結合により、胞胚を構成するICMとTEが決定される¹³⁾。そして、このような分化が進行するためには胞胚にはある程度の細胞数が必要であると考えられている¹⁴⁾。本実験において作製した核移植胚と単為発生胚による集合胚の胚盤胞形成率が対照区と比較して有意に高くなったのも、胚の活性化処理後の培養時間以外に分割ステージにおける細胞数の増加が関係しているのではないかと考えられる。しかし、核移植胚と単為発生胚による集合胚は、48 h + 48 h 区におけるブタ単為発生胚どうしの集合胚と比較して集合率が若干低い傾向が認

められ、胚盤胞形成率についても同様の傾向が認められた。そこで、集合させる胚どうしの発生ステージごとの組み合わせについても検討をおこなったところ、同じ発生ステージで集合させることが重要であることが明らかとなった。これには、コンパクション以外の要因が関わっているのではないかと考えられる。一つの要因としては、核移植胚において発生速度に遅延が起きている可能性が考えられ、それが単為発生胚と集合させた際に悪影響を及ぼし、集合率および胚盤胞形成率を低下させているのではないかと考えられる。

クローン技術は基礎生物学の研究手段、家畜の増産、絶滅危惧種の救済、再生医療への応用など非常に多くの点で有望とされているが、依然としてその発生率、すなわち作出効率は低く、その応用には克服しなければならない点が多い。本研究において、ブタ体細胞核移植胚を単為発生胚と集合させることで、核移植胚の胚盤胞への発生能を改善することができた。

要 約

ブタ体細胞核移植胚の発生能は低く、産子作出効率は極めて低い。しかし、体細胞核移植を介したトランスジェニックブタの作製法は、DNA顕微注入法よりも有利な点が多い。本研究はブタ体細胞核移植胚の発生能の改善を目的とし、単為発生胚と体細胞核移植胚を集合させ、その集合胚の発生能を検討した。

実験1：ブタ初期胚の集合胚作製条件を検討するために、発生ステージが異なる単為発生胚どうしの集合胚の集合率および胚盤胞への発生率を調べた。単為発生胚は、48 h体外成熟培養後の卵母細胞に1 kV/cm, 64 μ sec, 0.5 sec間隔で三回印可による活性化誘起処理を施し、サイトカラシンBで倍数体処理をおこなって作出した。活性化処理後48あるいは72 hに0.5% pronaseにより透明帯を除去し、発生ステージの異なる単為発生胚を3通りの組み合わせ(48 h + 48 h区, 48 h + 72 h区, 72 h + 72 h区)で集合させ、その集合率、胚盤胞への発生率および胚盤胞の細胞数を調べた。活性化処理48 h後に透明帯除去し、集合させずに培養したものを対照区とした。透明帯除去単為発生胚の集合率および胚盤胞への発

生率は、48 h + 48 h区で58.3% (60/103) および50.5% (52/103), 48 h + 72 h区で28.5% (43/151) および22.5% (34/151), 72 h + 72 h区で38.6% (71/184) および28.8% (53/184) となり、48 h + 48 h区が他の区に比べ有意に ($P < 0.05$) 高い値を示した。また、対照区は胚盤胞への発生率が36.7% (18/49) で、48 h + 48 h区より有意に ($P < 0.05$) 低い値を示した。集合胚由来の胚盤胞における細胞数は、各区が対照区に比べ有意に ($P < 0.05$) 高い値を示した。実験2：実験1の結果から、活性化処理後48 hに透明帯除去させた単為発生胚と卵丘細胞をドナーとした核移植胚とを集合させ(集合区)、その集合率、胚盤胞への発生率および胚盤胞の細胞数を調べた。活性化処理48 h後に透明帯除去し、集合させなかった核移植胚を対照区とした。集合胚由来の胚盤胞への発生率および胚盤胞の細胞数は38.2% (39/102) および55.3 \pm 4.3, 対照区では20.9% (9/43) および25.3 \pm 2.5であり、集合区が対照区に比べ有意に ($P < 0.05$) 高い胚盤胞への発生率を示した。

以上の結果から、ブタ体細胞核移植胚と単為発生胚とともに活性化処理後48 hに集合させることで、ブタ体細胞核移植胚の胚盤胞への発生能が改善することが示唆された。

参 考

- 1) Petters RM, Wells KD, Culture of pig embryos. J. Reprod. Fertil. 1993; 48(suppl): 61-73.
- 2) Kikuchi, K., A. Onishi, N. Kasiwazaki, M. Iwamoto, J. Noguchi, H. Kaneko, T. Akita and T. Nagai. Successful Piglet Production after Transfer of Blastocysts Produced by a Modified In Vitro System. Biol. Replod. 2002; 66: 1033-1041.
- 3) Onishi, A., M. Iwamoto, T. Akita, S. Mikawa, K. Takeda, T. Awata, H. Hanada, Anthony C. F. Perry. Pig Cloning by Microinjection of Fetal Fibroblast Nuclie. Science. 2000; 289: 1188-90.
- 4) Jie Zhu, E. E. Telfer, Judy Fletcher, Anthea Springbett, J. R. Dobrinsky, P. A. DE Sousa and I. Wilmut. Improvement of an Electrical Activation Protocol for Porcine Oocytes. Biol. Replod. 2002; 66: 635-641.
- 5) Nagai, T., T. Takahashi, H. Masuda, Y. Shioya, M. Kuwayama, M. Fukushima, S. Iwasaki, A. Hanada. In Vitro fertilization of pig oocytes by frozen boar

- spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 1988; 84: 585-591.
- 6) Suzuki, K., B. Eriksson, H. Shimizu, T. Nagai, H. Rodorigues-Martinez. Effect of hyaluronan on monospermic penetration of porcine oocytes fertilized in vitro. *Int. J. Androl.* 2000; 23: 13-21.
 - 7) Kikuchi, K., A. Onishi, N. Kashiwazaki, M. Iwamoto, J. Noguchi, H. Kaneko, T. Akita, and T. Nagai. Successful Piglet Production after Transfer of Blastocysts Produced by a Modified In Vitro System. *Biol. Reprod.* 2002; 66: 1033-41.
 - 7) Vajta, G., T. T. Peura, P. Holm, A. Paldi, T. Greve, A. O. Trouson, and H. Callesen. New Method for Culture of Zona-Included or Zona-Free Embryos: the Well of the Well (WOW) System. *Mol. Reprod. Dev.* 2000; 55: 256-264.
 - 8) Boiani, M., S. Eckardt, N. A. Leu, H. R. Scholer and K. J. McLaughlin. Pluripotency deficit in cloned overcome by clone-clone aggregation: epigenetic complementation? *EMBO J.* 2003; 22: 5304-5312.
 - 9) Maro, B., and S. F. Pickering. Microtubules influence compaction in preimplantation mouse embryos. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1984; 84: 217-232.
 - 10) Conacci-Sorrell, M., I. Simcha, T. Ben-Yedidia, J. Blechman, P. Savagner, and A. Ben-Ze'ev. Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the role of β -catenin signaling, Slug and MAPK. *J. Cell Biol.* 2003; 163: 847-857.
 - 11) Neganova, I. E., G. G. Sekirina, and U. Eichenlaub-Ritter. Surface-expressed E-cadherin, and mitochondrial and microtubule distribution in rescue of mouse embryos from 2-cell block by aggregation. *Mol. Hum. Reprod.* 2000; 6: 454-464.
 - 12) Reima, I., E. Lehtonen, I. Virtanen, JE. Flechon. The cytoskeleton and associated proteins during cleavage, compaction and blastocyst differentiation in the pig. *Differentiation.* 1993; 54: 35-45.
 - 13) Ducibella, T., T. Ukane, M. Karnovsky, and E. Anderson. Changes in cell surface and cytoplasmic organization during early embryogenesis in the preimplantation mouse embryo. *J. Cell Biol.* 1977; 74: 153-167.